

观赏羽衣甘蓝 SSR 标记分型与亲缘关系研究

郭 宁¹, 高怀杰^{1,2}, 韩 硕¹, 宗 梅¹, 王桂香¹, 张月云¹, 刘 凡¹

¹北京市农林科学院蔬菜研究中心/农业部华北地区园艺作物生物学与种质创制重点实验室, 北京 100097;

²河北科技师范学院生命科技学院, 秦皇岛 066004)

摘要:观赏羽衣甘蓝凭借优良的观赏特性和抗逆性已经成为重要的冷季观赏植物。国内观赏羽衣甘蓝育种起步较晚, 并且缺乏对种质资源遗传背景的系统研究。本研究应用 SSR 标记对不同类型的观赏羽衣甘蓝材料进行标记分型和亲缘关系分析。从 99 对均匀分布于甘蓝基因组的 SSR 引物中筛选出 46 对多态性好的引物, 对 27 份不同类型的观赏羽衣甘蓝材料进行标记分型, 共扩增出 210 个多态性位点, 平均 PIC 值为 0.58。进一步利用标记分型结果进行 STRUCTURE 群体结构、UPGMA 聚类和聚类热图分析, 结果显示 3 种分析结果基本一致, 可以将 27 份材料分为圆叶、羽叶和皱叶 3 种类型, 其中圆叶和羽叶类型的亲缘关系更近, 与皱叶类型的亲缘关系较远; STRUCTURE 分析还可以将双亲为不同类型的杂交种材料进行区分; 聚类热图分析可以将标记分型结果形象的展示出来。本研究为进一步建立观赏羽衣甘蓝分子指纹图谱, 明确种质资源的遗传背景, 建立观赏羽衣甘蓝分子标记辅助选择育种体系, 培育具有自主知识产权的新品种奠定基础。

关键词:观赏羽衣甘蓝; SSR 标记分型; 群体结构; 聚类分析; 亲缘关系

Genotypic and Genetic Relationship Analysis of Ornamental Kale (*Brassica oleracea* var. *acephala*) by SSR Markers

GUO Ning¹, GAO Huai-jie^{1,2}, HAN Shuo¹, ZONG Mei¹, WANG Gui-xiang¹, ZHANG Yue-yun¹, LIU Fan¹

¹Beijing Vegetable Research Center, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences/Key Laboratory of Biology and Genetic Improvement of Horticultural Crops (North China), Ministry of Agriculture, Beijing 100097;

²College of Life Science and Technology, Hebei Normal University of Science and Technology, Qinhuangdao 066004)

Abstract: Kales (*Brassica oleracea* L., var. *acephala* DC.), which are widely cultivated as ornamental plants in wintertime or cold areas, play important roles for urban landscaping. Domestic breeding of ornamental kale starts later, and there was a lack of system researches about genetic backgrounds of germplasm resources. SSR markers were utilized in this research for genotypic and genetic relationship analysis of different ornamental kale types. 46 pairs of polymorphic SSR primers from 99 SSR primers which were uniformly distributed on *B. oleracea* L. genome were selected for polymorphism and genotypic analysis of 27 ornamental kales. 210 polymorphic loci were obtained by 46 pairs of SSR primers and the average polymorphism information content (PIC) was 0.58. The genotypic result of 27 ornamental kales was used for further STRUCTURE, UPGMA and heat map clustering analysis. 27 ornamental kales were classified into three groups: round leaf group, leather leaf group and crinkle leaf group by STRUCTURE, UPGMA and heat map clustering analysis whose clustering results were consistent. Round leaf and leather leaf group had close genetic relationship, while crinkle leaf group had longer genetic distance with them. And STRUCTURE analysis could also distinct hybrids whose parents belonged to diverse groups. The genotypic results could be well demonstrated by heat map clustering analysis. These results could lay the foundation for constructing molecular fingerprints

收稿日期: 2016-05-26 修回日期: 2016-09-30 网络出版日期: 2017-02-17

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20170217.1124.014.html>

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31501752); 北京市农林科学院财政专项 (KJXC20140423); 国家星火计划项目 (2015GA600004)

第一作者研究方向为蔬菜生物技术与遗传育种。E-mail: guoning@nervc.org

通信作者: 刘凡, 研究方向为蔬菜生物技术与遗传育种。E-mail: liufan@nervc.org

of ornamental kale, illuminating genetic background of germplasm resources, molecular assistant selection in ornamental kale breeding, and breeding of new varieties with independent intellectual property rights.

Key words: ornamental kale; SSR genotyping; population structure; clustering analysis; genetic relationship

羽衣甘蓝(*Brassica oleracea* L. var. *acephala* DC.; 2n=18)是十字花科芸薹属甘蓝种的一个变种,两年生草本,叶形多样,叶色绚丽,营养丰富,既可用于城市绿化,也是餐桌上的美食,具有赏食兼用的特点^[1]。其不仅观赏性佳,而且具有很强的抗寒耐冻性和耐旱性,日本、英国、荷兰、德国和美国作为园林景观植物培育和种植较多,近年来在我国华北、华东、华中以及东北和西南地区作为冷季主要观赏植物也被广泛应用。观赏羽衣甘蓝原产于地中海和小亚细亚一带,在甘蓝类作物中与野生甘蓝、结球甘蓝、紫甘蓝、皱叶甘蓝、苜蓝和孢子甘蓝同属于欧洲西北部沿海地区类群^[2]。观赏羽衣甘蓝在叶形叶色上变异丰富,根据叶形可以分为皱叶(crinkle leaf)、圆叶(round leaf)和羽叶(leather leaf)3种类型;从叶色来分,中心显色叶有纯白、黄白、黄绿、粉红、淡紫红、玫瑰红、紫红等,外叶叶色有翠绿色、深绿色、灰绿色、黄绿色等。

分子标记分型技术因具有不受环境影响、测试周期短、供选择的标记数量多、可以进行高通量测序分析的优势,已经广泛用于遗传多样性和亲缘关系分析,新品种鉴定、种子纯度及品种真实性检测,分子标记辅助育种等研究和应用中。SSR技术已广泛应用于小麦^[3]、马铃薯^[4]、番茄^[5]、油菜^[6]、大白

菜^[7]、甘蓝^[8]等多种作物的标记分型、指纹图谱和遗传图谱构建等研究中。

本研究应用引种的自交系、小孢子培养获得的优良双单倍体(DH, double haploid)纯系以及具有自主知识产权的新品种等27份不同类型观赏羽衣甘蓝材料作为研究试材,利用SSR标记进行标记分型研究,为揭示不同类型观赏羽衣甘蓝的遗传关系、构建观赏羽衣甘蓝分子指纹图谱奠定基础,为羽衣甘蓝分子辅助育种提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

应用北京市农林科学院蔬菜研究中心生物技术研究室引种的羽衣甘蓝自交系4份,通过小孢子培养技术获得的DH系16份,一代杂交品种(F₁)7份,共计27份材料。其中,皱叶类型材料10份,圆叶类型材料10份,羽叶类型材料7份;红色材料13份,白色材料13份,粉色材料1份。材料名称类型等信息详见表1和图1。

将种子放于装有湿润滤纸的培养皿中催芽5~6d,选取子叶和下胚轴,采用改良CTAB法提取样品DNA。

表1 27份羽衣甘蓝材料

Table 1 27 ornamental kale materials in this research

| 编号 No. | 名称 Name | 来源 Source | 类型 Type | 表型 Phenotype |
|-----------|------------|------------------------------|----------------------------|----------------------------|
| 1 | 05-DH-44 | 小孢子培养 Micro spore culture | 双单倍体 Double haploid(DH) | 红色羽叶 Red leather leaf |
| 2 | 06-DH-77 | 小孢子培养 Micro spore culture | 双单倍体 Double haploid(DH) | 白色羽叶 White leather leaf |
| 3 | 11-DH-312 | 小孢子培养 Micro spore culture | 双单倍体 Double haploid(DH) | 红色羽叶 Red leather leaf |
| 4 | 05-DH-51 | 小孢子培养 Micro spore culture | 双单倍体 Double haploid(DH) | 红色圆叶 Red round leaf |
| 5 | 07-DH-33 | 小孢子培养 Micro spore culture | 双单倍体 Double haploid(DH) | 白色皱叶 White crinkle leaf |
| 6 | Y-J-162 | 引种 Introduction | 高代自交系 Self-line | 白色皱叶 White crinkle leaf |
| 7 | 05-DH-65 | 小孢子培养 Micro spore culture | 双单倍体 Double haploid(DH) | 红色圆叶 Red round leaf |

表 1(续)

| 编号 No. | 名称 Name | 来源 Source | 类型 Type | 表型 Phenotype |
|-----------|-------------------------------------|------------------------------|----------------------------|----------------------------|
| 8 | 07-DH-34 | 小孢子培养 Micro spore culture | 双单倍体 Double haploid(DH) | 白色圆叶 White round leaf |
| 9 | Y-J-164 | 引种 Introduction | 高代自交系 Self-line | 白色皱叶 White crinkle leaf |
| 10 | 05-DH-72 | 小孢子培养 Micro spore culture | 双单倍体 Double haploid(DH) | 白色圆叶 White round leaf |
| 11 | 07-75 | 引种 Introduction | 高代自交系 Self-line | 白色皱叶 White crinkle leaf |
| 12 | 京冠白 4 号 'Jingguanbai 4#' | 杂交种 F ₁ hybrid | 商品种 Commercial variety | 白色皱叶 White crinkle leaf |
| 13 | 05-DH-126 | 小孢子培养 Micro spore culture | 双单倍体 Double haploid(DH) | 红色皱叶 Red crinkle leaf |
| 14 | 10-DH-58 | 小孢子培养 Micro spore culture | 双单倍体 Double haploid(DH) | 白色圆叶 White round leaf |
| 15 | 京冠红 6 号 'Jingguanhong 6#' | 杂交种 F ₁ hybrid | 商品种 Commercial variety | 红色皱叶 Red crinkle leaf |
| 16 | 06-DH-62 | 小孢子培养 Micro spore culture | 双单倍体 Double haploid(DH) | 红色圆叶 Red round leaf |
| 17 | 10-DH-64 | 小孢子培养 Micro spore culture | 双单倍体 Double haploid(DH) | 白色圆叶 White round leaf |
| 18 | 京莲白 3 号 'Jinglianbai 3#' | 杂交种 F ₁ hybrid | 商品种 Commercial variety | 白色圆叶 White round leaf |
| 19 | 06-DH-71 | 小孢子培养 Micro spore culture | 双单倍体 Double haploid(DH) | 白色羽叶 White leather leaf |
| 20 | 10-DH-105 | 小孢子培养 Micro spore culture | 双单倍体 Double haploid(DH) | 红色皱叶 Red crinkle leaf |
| 21 | 京莲红 2 号 'Jinglianhong 2#' | 杂交种 F ₁ hybrid | 商品种 Commercial variety | 红色圆叶 Red round leaf |
| 22 | 06-DH-76 | 小孢子培养 Micro spore culture | 双单倍体 Double haploid(DH) | 白色圆叶 White round leaf |
| 23 | 10-DH-123 | 小孢子培养 Micro spore culture | 双单倍体 Double haploid(DH) | 红色皱叶 Red crinkle leaf |
| 24 | 京羽红 2 号 'Jingyuhong 2#' | 杂交种 F ₁ hybrid | 商品种 Commercial variety | 红色羽叶 Red leather leaf |
| 25 | 京羽红 4 号 'Jingyuhong 4#' | 杂交种 F ₁ hybrid | 商品种 Commercial variety | 红色羽叶 Red leather leaf |
| 26 | 京羽粉 2 号 'Jingyufen 2#' | 杂交种 F ₁ hybrid | 商品种 Commercial variety | 粉色羽叶 Pink leather leaf |
| 27 | 引种皱红 Introduced red crinkle leaf | 引种 Introduction | 高代自交系 Self-line | 红色皱叶 Red crinkle leaf |

品种名称加粗显示的材料为用于引物筛选的材料

The materials whose names shown in bold were used for markers selection



图片编号与表 1 中材料编号一致

The No. on pictures consistent with No. of materials in table 1

图 1 27 份羽衣甘蓝显色期照片

Fig. 1 The photos of the 27 ornamental kales on colored period

1.2 SSR 标记分型

本试验的 SSR 引物来自 W. X. Wang 等^[9]2012 年发表的甘蓝遗传连锁图谱,共选用了在基因组上均匀分布的 99 对引物,平均每条染色体上 11 对,由北京擎科新业生物技术有限公司(TsingKe biological Technology Co., Ltd.)合成。

PCR 反应采用 15 μ L 反应体系,其中包括模板 DNA (10 ng/ μ L) 5 μ L, 10 \times Buffer (含 $MgCl_2$ 15 mmol/L) 1.5 μ L, dNTP (2.5 mmol/L each) 1.3 μ L, 上下游引物 (10 μ mol/L) 各 0.5 μ L, Taq 酶 (5 U/ μ L) 0.2 μ L, ddH₂O 6 μ L, 所用试剂均购自北京全式金生物技术有限公司(TransGen Biotech Co., Ltd.)。

PCR 反应程序为 94 $^{\circ}C$ 预变性 4 min; 94 $^{\circ}C$ 变性 30 s, 60 $^{\circ}C$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}C$ 延伸 45 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}C$ 延伸 7 min; 4 $^{\circ}C$ 保存。

应用 6% (29:1) 的聚丙烯酰胺凝胶进行标记分离,电泳设定 160 V 恒压 2 h,电泳完成后,采用快速银染法^[10]对凝胶进行染色显影和拍照统计。

先选用 6 份不同类型的材料(在表 1 中加粗显示)进行标记筛选,选择至少在 2 份材料中存在多态性的标记用于 27 份羽衣甘蓝材料的标记分型研究。

1.3 SSR 标记统计与数据分析

先确定某个位点的等位变异数,统计同一材料某个等位变异的有无,在相同迁移率位置上,有带记为 1,无带记为 0,缺失记为 9 或 -999。为保证数据准确、可靠,每块胶板均由 2 人独立记录,然后比对,不清楚的条带和有争议的数据均作为缺失处理。

利用记录结果计算各个引物多态性信息含量 (PIC, polymorphism information content)。PIC = $1 - \sum (P_i)^2$, 其中 P_i 为群体中含有第 i 个等位位点的频率。引物多态性信息含量主要用来说明引物多态性高低^[11]。

应用 Structure v2.3.4 软件^[12],对 27 份羽衣甘蓝材料进行群体结构聚类分析。每次运行 MCMC

(Markov Chain Monte Carlo) 开始时不作数迭代 (length of burn-in period) 数设定为 10000, 再将不作数迭代后的重复次数设定为 100000 次。选择等位基因频率相关模型。设定亚群数目为 2 ~ 10, 每个 K 值重复运行 3 次^[13]。

应用 NTSYSpc2. 11 软件采用 UPGMA 进行聚类分析, 计算遗传相似系数, 根据遗传相似系数生成聚类图。

应用 R 语言利用各标记在不同材料中统计的 0、1 数据进行聚类热图分析, 根据标记分析结果对材料进行聚类。

2 结果与分析

2.1 引物筛选与多态性分析

利用 05-DH-65 (红色圆叶)、07-75 (白色皱叶)、10-DH-105 (红色皱叶)、Y-J-164 (白色皱叶)、05-DH-126 (红色皱叶)、10-DH-58 (白色圆叶) 等 6 份材料 (表 1 中名称加粗显示材料) 对 99 对 SSR 引物进行多态性筛选, 共筛选出材料间带型差异较大、条带清楚、易识别、并可以稳定扩增的 46 对 (表 2), 用于 27 份观赏甘蓝材料的标记扩增和分型研究, 部分引物筛选扩增如图 2 所示。

表 2 筛选出的 46 对引物在染色体上的分布、扩增位点数和多态性信息含量

Table 2 The distribution on chromosomes, numbers of amplified loci and PIC of the selected 46 pairs of primers

| 标记编号 Marker No. | 标记名称 Marker name | 染色体 Chr. | 位点数 Loci No. | 多态性信息含量 PIC | 标记编号 Marker No. | 标记名称 Marker name | 染色体 Chr. | 位点数 Loci No. | 多态性信息含量 PIC |
|--------------------|---------------------|-------------|-----------------|----------------|--------------------|---------------------|-------------|-----------------|----------------|
| BoS01-3 | BrBAC004 | C01 | 2 | 0.204 | BoS05-12 | BoSF2390 | C05 | 7 | 0.778 |
| BoS01-4 | BrSF257 | C01 | 3 | 0.397 | BoS06-1 | BoSF2791 | C06 | 2 | 0.375 |
| BoS01-5 | CB10369 | C01 | 5 | 0.743 | BoS06-5 | BoE569 | C06 | 8 | 0.813 |
| BoS02-4 | BoE162 | C02 | 5 | 0.663 | BoS06-6 | BoSF1838 | C06 | 9 | 0.792 |
| BoS02-10 | BoSF2227 | C02 | 3 | 0.579 | BoS06-7 | BoSF1215 | C06 | 2 | 0.327 |
| BoS03-1 | BoSF1131 | C03 | 11 | 0.885 | BoS06-8 | BoSF1875 | C06 | 5 | 0.709 |
| BoS03-2 | BrBAC214 | C03 | 4 | 0.584 | BoS06-9 | BoSF2081 | C06 | 2 | 0.286 |
| BoS03-4 | BoSF905 | C03 | 4 | 0.661 | BoS07-7 | BoE340 | C07 | 6 | 0.799 |
| BoS03-6 | BoSF042 | C03 | 3 | 0.503 | BoS07-9 | BoSF2819 | C07 | 4 | 0.662 |
| BoS03-10 | BoSF2882 | C03 | 6 | 0.782 | BoS08-2 | BoE916 | C08 | 2 | 0.323 |
| BoS03-11 | BoSF1342 | C03 | 6 | 0.773 | BoS08-3 | BoE756 | C08 | 5 | 0.757 |
| BoS04-1 | BrSF024 | C04 | 3 | 0.462 | BoS08-4 | BoSF1224 | C08 | 7 | 0.803 |
| BoS04-3 | BoSF1047 | C04 | 3 | 0.568 | BoS08-5 | BoSF2407 | C08 | 15 | 0.924 |
| BoS04-5 | BoSF1957 | C04 | 3 | 0.548 | BoS08-8 | BoSF1949 | C08 | 4 | 0.630 |
| BoS04-6 | BoSF1378 | C04 | 2 | 0.346 | BoS08-9 | BoSF233 | C08 | 12 | 0.890 |
| BoS04-7 | BoE530 | C04 | 2 | 0.356 | BoS08-10 | BoSF2002 | C08 | 10 | 0.859 |
| BoS04-8 | BoSF1930 | C04 | 2 | 0.310 | BoS08-11 | BoSF1259 | C08 | 4 | 0.660 |
| BoS05-3 | BoSF1219 | C05 | 2 | 0.375 | BoS09-3 | BoSF2206 | C09 | 7 | 0.801 |
| BoS05-6 | BoSF2562 | C05 | 4 | 0.589 | BoS09-4 | BoSF368 | C09 | 2 | 0.372 |
| BoS05-7 | BoSF169 | C05 | 2 | 0.375 | BoS09-6 | BoSF2421 | C09 | 5 | 0.761 |
| BoS05-8 | BoSF2574 | C05 | 2 | 0.371 | BoS09-7 | BoSF1553 | C09 | 2 | 0.372 |
| BoS05-9 | BoSF1464 | C05 | 2 | 0.071 | BoS09-9 | BoSF2679 | C09 | 4 | 0.690 |
| BoS05-10 | BoSF1662 | C05 | 2 | 0.305 | BoS09-10 | BoSF2720 | C09 | 5 | 0.701 |

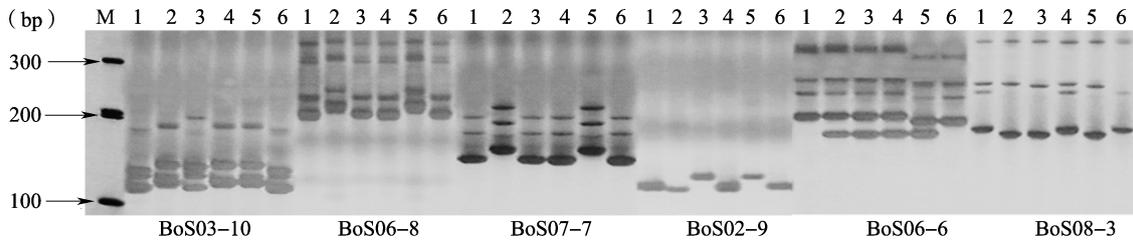


图 2 部分多态性 SSR 引物筛选扩增结果

Fig. 2 Some amplification results of the selection of polymorphism SSR primers

46 对多态性 SSR 引物在甘蓝 9 条染色体上分布较为均匀,最多的为 C08 染色体 8 对,最少的为 C02 和 C07 只有 2 对。46 对 SSR 引物在 27 份观赏羽衣甘蓝材料中共扩增出 210 条多态性条带,平均每对引物多态性条带 4.6 条,最少的 2 条,最多的 12 条。46 对引物的多态信息含量(PIC)的变化范围是 0.071 ~ 0.924,平均 PIC 为 0.58(表 2)。D. Botstein 等^[14]首先提出了衡量基因变异程度高

低的多态性信息量指标,当 $PIC \geq 0.5$ 时,该引物为高度多态性信息引物,当 $0.25 \leq PIC < 0.5$ 时为中度多态性信息引物,当 $PIC < 0.25$ 时为低度多态性信息引物。46 对引物中 29 对引物 $PIC \geq 0.5$, 15 对引物 $0.25 \leq PIC < 0.5$, 2 对引物 $PIC < 0.25$, 引物多态性较好,可以用于 SSR 标记分型研究。图 3 为引物 BoS03-6 在 27 份观赏羽衣甘蓝材料中的扩增结果。

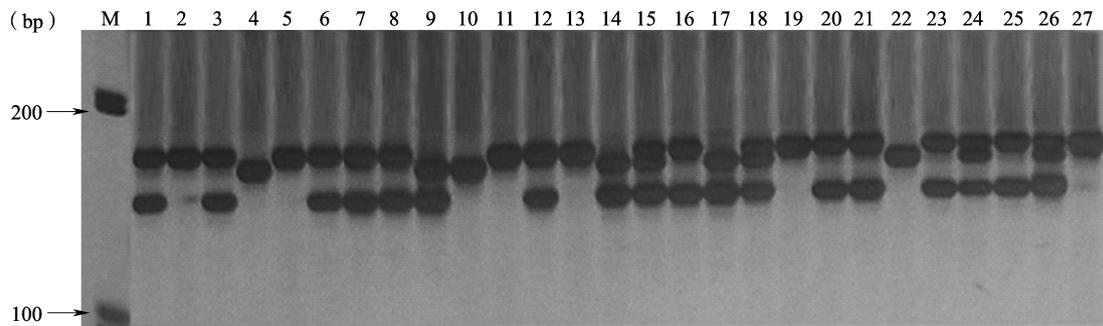


图 3 引物 BoS03-6 在 27 份观赏羽衣甘蓝材料中的扩增胶图

Fig. 3 The gel picture of primer BoS03-6 amplification in 27 ornamental kales

2.2 27 份羽衣甘蓝群体结构分析

利用筛选出来的 46 对 SSR 引物在 27 份观赏羽衣甘蓝材料中的扩增结果进行 STRUCTURE 群体结构分析。分析结果显示,在 $K = 4$ 时 ΔK 值最大,其次为 $K = 3$; $K > 4$ 时 ΔK 值迅速降低(图 4)。因此软件分析结果建议将 27 份材料分为 4 类^[13],本研究对 $K = 2, 3, 4$ 的分类结果进行分析,研究分为 2 类、3 类和 4 类的分类情况。 $K = 2$,即将群体分为 2 类时,羽叶类型材料和圆叶类型材料聚为一类,皱叶类型材料聚为另一类(图 5A),这说明羽叶和圆叶类型材料亲缘关系相对较近。当 $K = 3$,即将群体分为 3 类时,圆叶、羽叶和皱叶类型材料分别单独聚为一类。而且从材料的遗传构成上可以将不同类型间的杂交种区分出来,如京羽红 2 号(编号为 24)和京羽粉 2 号(编号为 26)为 2 份宽羽类型材料,它们均由圆叶和羽叶类型 DH 材料杂交获得(图 5B)。当

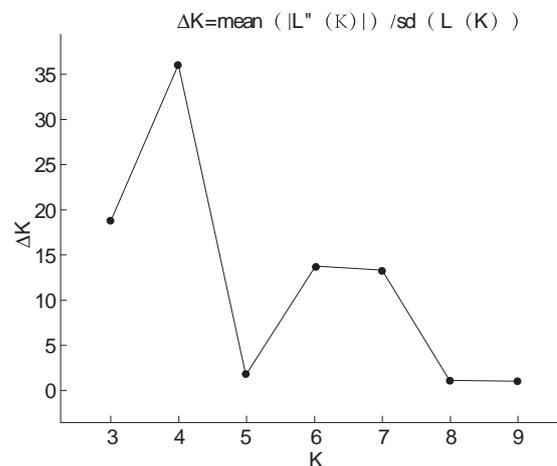


图 4 ΔK 随着亚群数目 K 的变化

Fig. 4 ΔK plotted against subgroup number K

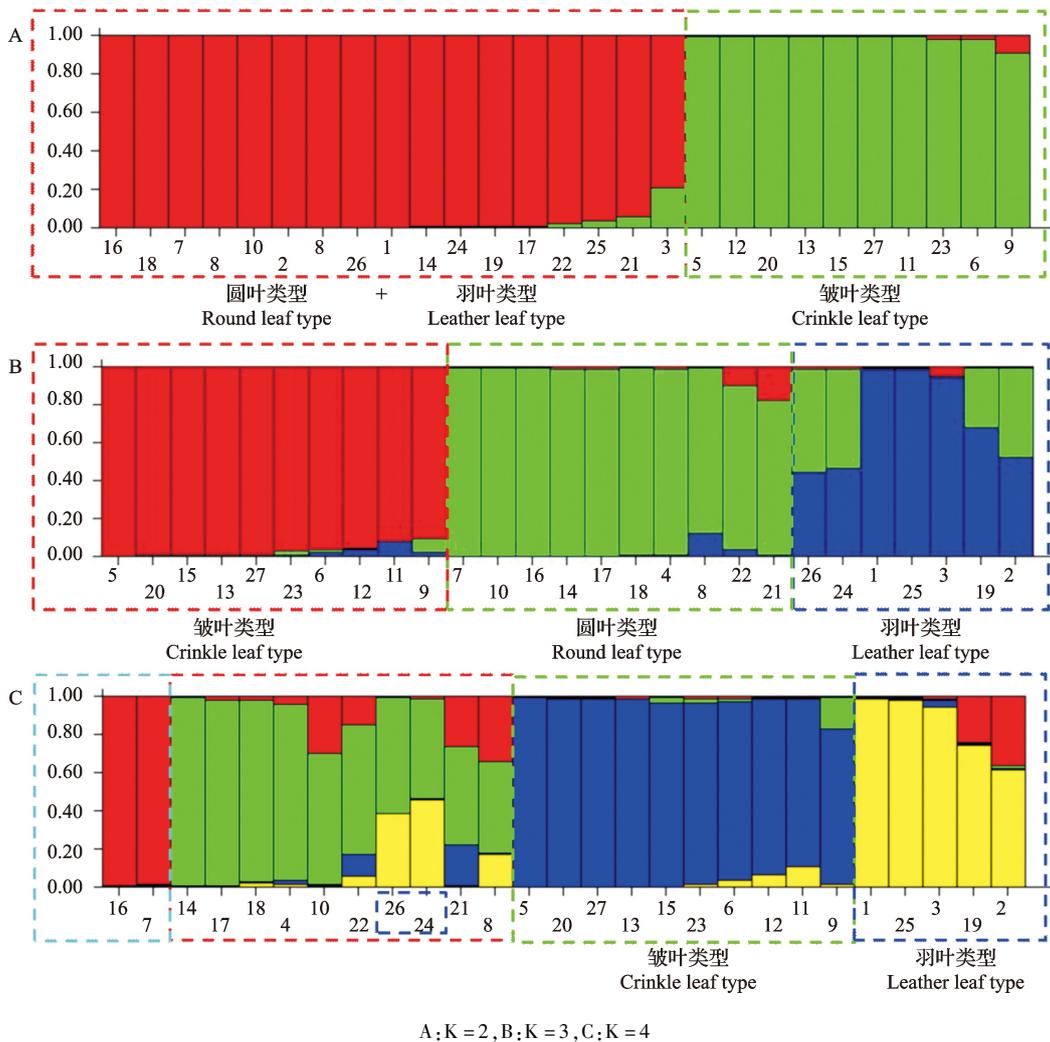


图5 K = 2,3,4 时 27 份观赏羽衣甘蓝材料群体结构图

Fig. 5 The Structure bar plot of 27 ornamental kales when K = 2,3,4

K = 4 时,2 份红色圆叶类型材料 05-DH-65 (编号为 7) 和 06-DH-62 (编号为 16) 单独分为一类,剩余的圆叶类型和 2 份宽羽杂交种分为一类,皱叶类型单独分为一类,羽叶类型分为一类。这说明 2 份红色圆叶材料可能和其他圆叶材料亲缘关系相对较远 (图 5C)。根据 STRUCTURE 群体结构分析,46 对 SSR 引物能够将 27 份羽衣甘蓝材料进行很好区分,遗传结构分类和表型特征基本一致。

2.3 27 份羽衣甘蓝 SSR 聚类分析

根据 SSR 引物标记分型结果建立数据矩阵后用 NTSYSpc2.11 软件计算 27 份不同类型观赏羽衣甘蓝间的遗传相似系数,应用 UPGMA 法进行聚类分析得到 27 份观赏羽衣甘蓝材料的聚类分析树状图 (图 6)。在相似系数 0.52 处,可以将 27 份观赏羽衣甘蓝材料分为 2 类,其中圆叶和羽叶类型材料分为一类,皱叶类型材料单独分为一类。在相似系数 0.57 处,27 份材料分为 3 类,羽叶、圆叶和皱叶

类型各分为一类。聚类分析结果基本与 STRUCTURE 分析结果一致,46 对 SSR 引物可以根据材料的叶形对 27 份观赏甘蓝材料进行很好的分类,羽叶和圆叶类型材料相对于皱叶类型具有更近的亲缘关系。

2.4 27 份羽衣甘蓝 SSR 标记聚类热图分析

根据 46 对 SSR 引物对 27 份观赏羽衣甘蓝材料标记分型统计的 0、1 数据,应用 R 语言进行聚类热图分析。图 7 显示,有条带即 1 用红色表示,没有条带即 0 用蓝色表示。根据 0、1 分型结果首先分为两大类,第一大类全部为皱叶类型,第二大类又分为圆叶类型和羽叶类型 2 类 (图 7)。聚类热图分析结果与 STRUCTURE 和 UPGMA 聚类分析结果相吻合,说明圆叶和羽叶类型具有更近的亲缘关系,也进一步印证了标记分型结果的准确性。聚类热图可以将标记分型的结果直观的展示出来,可进一步用于羽衣甘蓝指纹图谱分析。

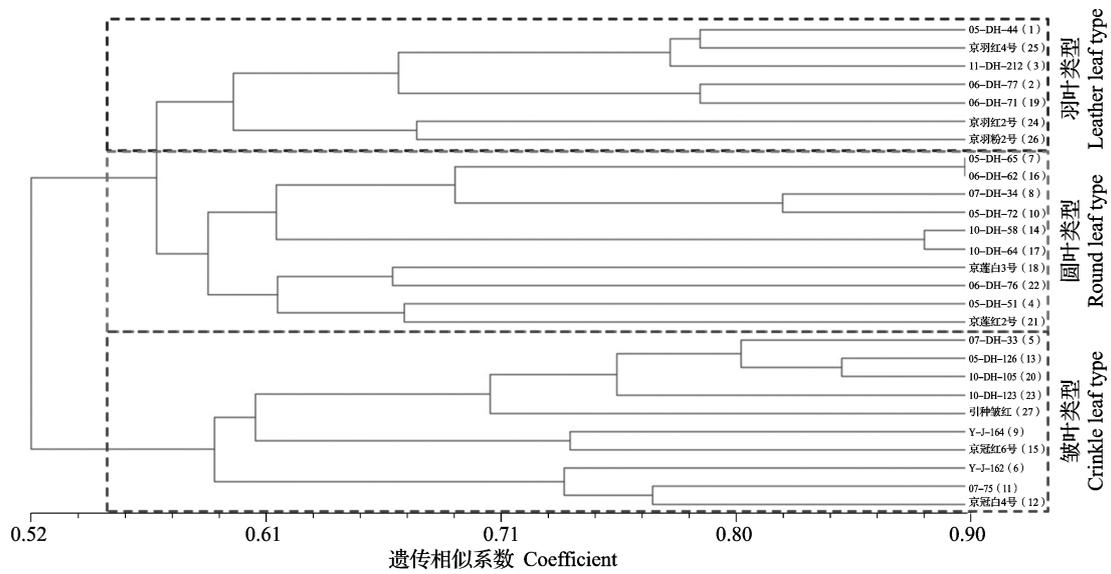


图 6 基于 SSR 分析的 27 份观赏羽衣甘蓝类材料聚类树状图

Fig. 6 The dendrogram of 27 ornamental kales by UPGMA cluster analysis based on SSR markers

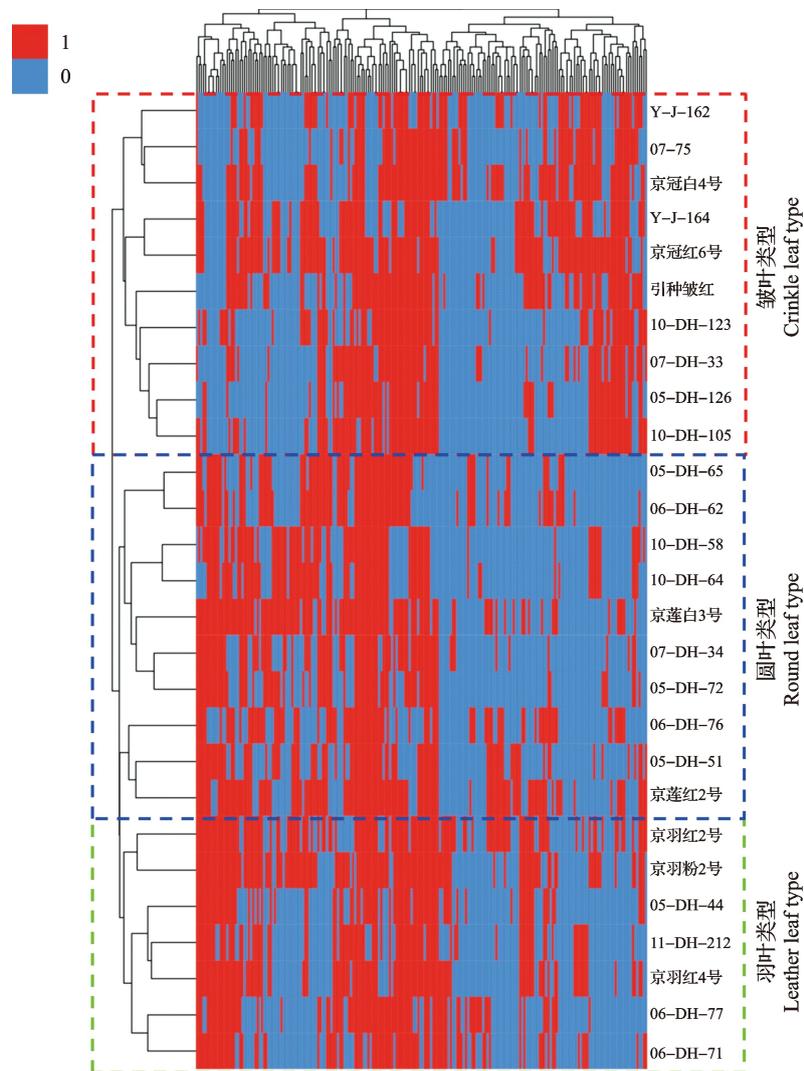


图 7 27 份羽衣甘蓝 SSR 标记分型聚类热图

Fig. 7 The heat map of 27 ornamental kale SSR genotyping

3 讨论

3.1 羽衣甘蓝亲缘关系研究的重要意义

羽衣甘蓝为甘蓝种的散叶变种,原产地中海和小亚细亚一带,为典型的异花授粉植物,杂种优势明显,且多为自交不亲和系^[15],商品种均为 F₁ 杂交种。国外羽衣甘蓝品种选育多为商业育种,日本为羽衣甘蓝的主要育种国,近 20 年来已经培育出 40 多个品种。我国观赏羽衣甘蓝育种工作起步较晚,引种栽培始于 20 世纪 90 年代,近年来通过基于游离小孢子培养的育种技术,加快了育种进程,也获得了一批观赏性佳、抗逆性好的优良品种。目前关于观赏甘蓝的研究主要集中在引种栽培^[16-17]、离体培养^[18]、小孢子诱导^[19]及主要观赏性状的遗传传递趋势^[20-21]等方面。观赏羽衣甘蓝的株型、叶形和叶色丰富,多样性高,研究其及近缘物种的亲缘关系和遗传多样性对资源评价和创制,以及新品种培育具有重要意义。

3.2 SSR 标记分型准确体现羽衣甘蓝的遗传关系

E. Margalé 等^[22]利用 RAPD 标记对 24 份花椰菜、24 份甘蓝和 48 份羽衣甘蓝进行了遗传变异性分析,研究发现羽衣甘蓝可能由于大量的遗传交换导致连续的多样性,形成了一个同质性的群体。A. Okumus 等^[23]应用 7 对 RAPD 引物对土耳其黑海地区的 20 个羽衣甘蓝群体进行了遗传多样性分析,通过 UPGMA 聚类将其分为 3 个主要的类群和 4 个亚群,并与表型分类进行了比较,发现部分表型与遗传聚类的结果不一致,认为表型具有一定的局限性。张丽娜^[21]研究了羽衣甘蓝叶形和叶色的遗传规律,并应用 RAPD 标记分析了 14 个品种间的亲缘关系。张瑜等^[24]对 7 份白色观赏羽衣甘蓝菜材料进行表型和 SRAP 标记遗传相似性分析,农艺性状和 SRAP 标记聚类分析结果基本一致,分为皱叶和圆叶两大类群。刘滢等^[25]应用 RAPD 标记对羽衣甘蓝新品种的亲缘关系进行了聚类分析,研究结果显示叶形是决定亲缘关系的首要因素,羽叶与圆叶品种间亲缘关系较近,与皱叶品种间亲缘关系较远,而皱叶品种内部遗传距离也较远。祝朋芳等^[26]通过测定 24 个营养性状和 11 个生殖性状对 25 份羽衣甘蓝材料进行 UPGMA 分类,研究结果认为叶型是决定亲缘关系远近的第一要素,其次为叶色;皱叶与裂叶的亲缘关系相对较近,裂皱叶与其他 3 种叶型的亲缘关系较远。这些羽衣甘蓝亲缘关系与遗传多样性研究均基于形态学标记和 RAPD、SRAP 等分子标记。植物的表型除了遗传决定也在很大程度上受到生长环

境等外界因素的影响,形态学标记虽然简单直观、经济方便,但是其多态性差、标记数目少,而且受环境影响很大,存在着基因表达、调控、个体发育等复杂的中间环节,是生物多样性的间接的表型反映。RAPD 和 SRAP 分子标记均采用通用型简并引物,扩增产物稳定性较差,存在一定的假阳性。SSR 为序列特异性引物标记,具有多态性好以及共显性的特点。本研究应用相对均匀分布于甘蓝基因组的 46 对 SSR 标记,对不同类型的 27 份观赏羽衣甘蓝材料进行遗传关系分析。STRUCTURE 群体结构、UPGMA 聚类分析和聚类热图分析均可以将 27 份观赏羽衣甘蓝材料分为圆叶类型、羽叶类型和皱叶类型 3 类,而且圆叶和羽叶类型亲缘关系更近,STRUCTRE 分析还可以将亲本为不同类型的杂交种鉴定出来。这与刘滢等^[25]应用 RAPD 标记分析的结果一致,与祝朋芳等^[26]利用形态学标记分析的结果不一致,这说明利用分子标记进行遗传关系研究更加准确与稳定可靠。

本研究应用 SSR 分子标记对 27 份不同类型的观赏羽衣甘蓝材料进行标记分型和遗传关系研究,为建立羽衣甘蓝分子指纹图谱,了解种质资源的遗传背景和遗传多样性奠定基础,为分子标记辅助育种提供理论依据。

参考文献

- [1] 赵秀枢,李名扬,张文玲,等. 观赏羽衣甘蓝高频再生体系的建立 [J]. 基因组学与应用生物学,2009,28(1):141-148
- [2] 王冬梅,陈琛,王庆彪,等. 一个支持芥蓝起源于中国的分子证据 [J]. 中国蔬菜,2011(16):15-19
- [3] Song Q J, Shi J R, Singh S, et al. Development and mapping of microsatellite (SSR) markers in wheat [J]. Theor Appl Genet, 2005,110(3):550-560
- [4] Provan J, Powell W, Waugh R. Microsatellite analysis of relationships within cultivated potato (*Solanum tuberosum*) [J]. Theor Appl Genet, 1996,92(8):1078-1084
- [5] Shirasawa K, Asamizu E, Fukuoka H, et al. An interspecific linkage map of SSR and intronic polymorphism markers in tomato [J]. Theor Appl Genet, 2010,121(4):731-739
- [6] Li H, Younas M, Wang X, et al. Development of a core set of single-locus SSR markers for allotetraploid rapeseed (*Brassica napus* L.) [J]. Theor Appl Genet, 2013,126(4):937-947
- [7] Ramchiary N, Nguyen V D, Li X, et al. Genic microsatellite markers in *Brassica rapa*: development, characterization, mapping, and their utility in other cultivated and wild *Brassica* relatives [J]. DNA Res, 2011,18(5):305-320
- [8] Su Y, Liu Y, Li Z, et al. QTL analysis of head splitting resistance in cabbage (*Brassica oleracea* L. var. *capitata*) using SSR and InDel makers based on whole-genome re-sequencing [J]. PLoS One, 2015,10(9):e0138073
- [9] Wang W X, Huang S, Liu Y, et al. Construction and analysis of a high-density genetic linkage map in cabbage (*Brassica oleracea* L. var. *capitata*) [J]. BMC Genomics, 2012,13(1):523

(下转 358 页)